

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-509170

(43)公表日 平成11年(1999)8月17日

(51)Int.Cl.⁶
A 6 1 K 35/12
35/30

識別記号
AAB

F I
A 6 1 K 35/12
35/30

AAB

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21)出願番号 特願平8-527778
(86) (22)出願日 平成8年(1996)3月12日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)9月16日
(86)国際出願番号 PCT/US96/03337
(87)国際公開番号 WO96/28174
(87)国際公開日 平成8年(1996)9月19日
(31)優先権主張番号 08/402, 387
(32)優先日 1995年3月13日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニヴァーシティ オブ サウス フロリダ
アメリカ合衆国 フロリダ州 33620-7900 タンパ イースト ファウラー アベニュー 4202 エフエイオー 126
(72)発明者 サンバーグ ポール アール
アメリカ合衆国 フロリダ州 34610 スプリング ヒル パイロット カントリー ドライヴ 11751
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞移植用の移植促進剤としてのセルトーリ細胞

(57)【要約】

局在化組織中で持続された局在化免疫抑制効果を生じる方法がセルトーリ細胞を組織に近位に移植することにより行われる。

【特許請求の範囲】

1. セルトーリ細胞を標的組織に近位に移植することにより持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を標的組織中で生じる方法。
2. 前記移植工程がセルトーリ細胞及び標的組織と同じ型の移植組織を標的組織に同時移植するものとして更に特定される請求の範囲第1項に記載の方法。
3. セルトーリ細胞を神経細胞とともに哺乳類の中枢神経系に同時移植する請求の範囲第2項に記載の方法。
4. セルトーリ細胞と同時移植される神経細胞を最初にセルトーリ細胞と同時培養し、その同時培養物と一緒に同時移植する請求の範囲第3項に記載の方法。
5. 移植がセルトーリ細胞を中枢神経系に直接注入するものとして更に特定される請求の範囲第1項に記載の方法。
6. セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である請求の範囲第1項に記載の方法。
7. 哺乳類が癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患又は神経変性疾患を患っている請求の範囲第12項に記載の方法。
8. 癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、筋ジストロフィー、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するために、ブタセルトーリ細胞（その細胞は又栄養因子を *in situ* で分泌する）を被験者の中枢神経系に移植することにより持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を標的組織中で生じる方法。
9. 被験者がヒトである請求の範囲第8項に記載の方法。
10. セルトーリ細胞を標的組織に近位に移植することにより持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を標的組織中で生じるためのセルトーリ細胞の使用。
11. 前記移植がセルトーリ細胞及び標的組織と同じ型の移植組織を標的組織に同時移植するものとして更に特定される請求の範囲第10項に記載の使用。
12. セルトーリ細胞が神経細胞とともに哺乳類の中枢神経系に同時移植される請

求の範囲第11項に記載の使用。

13. セルトーリ細胞と同時移植される神経細胞が最初にセルトーリ細胞と同時培養され、その同時培養物が一緒に同時移植される請求の範囲第12項に記載の使用。

14. 移植がセルトーリ細胞を中枢神経系に直接注入するものと更に特定される請求の範囲第10項に記載の使用。

15. セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である請求の範囲第10項に記載の使用。

16. 哺乳類が癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患又は神経変性疾患を患っている請求の範囲第11項に記載の使用。

17. 癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、筋ジストロフィー、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するために、ブタセルトーリ細胞（その細胞は又栄養因子を *in situ* で分泌する）を被験者の中枢神経系に移植することにより持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を標的組織中で生じるためのセルトーリ細胞の使用。

18. 被験者がヒトである請求の範囲第17項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

細胞移植用の移植促進剤としてのセルトーリ細胞

技術分野

本発明は組織中で局在化された免疫抑制効果及び栄養効果を生じるための細胞の移植方法に関する。

発明の背景

細胞及び組織の移植は、肺囊胞性纖維炎（肺）、腎臓不全、変性心臓疾患から神経変性疾患までを含むが、これらに限定されない広範囲の疾患に治療上使用されている。

例として、中枢神経系(CNS)(脳及び脊髄)は、幾つかの神経変性疾患に例示される不十分な再生能を有する。このような疾患の例はパーキンソン病である。パーキンソン病の好ましい薬物療法は、ヒトにおけるこの疾患の症候を助けるL-ドーパである。しかしながら、神経損傷及び衰弱進行はこの治療プロトコルにより反転されない。

実験研究及び臨床研究は、CNSへの細胞の移植がパーキンソン病の如き神経変性疾患の潜在的に有意な別の治療様式であることを示していた(Wictorinら, 1990; Lindvallら, 1990; Sanbergら, 1994; Bjorklund及びStenevi, 1985; Freemanら, 1994)。或る場合には、移植された神経組織が生存し、レシピエント（即ち、宿主）のCNSとの結合を形成し得る(Wictorinら, 1990)。宿主により成功裏に受け入れられた場合、移植された組織（即ち、移植片）はその疾患と関連する挙動上の欠損を回復することが示されていた(Sanbergら, 1994)。この種の治療の成功に強制的な工程は移植片拒絶の防止（即ち、移植片許容）である。

現在、胎児神経組織が神経移植の主要な移植片源である(Lindvallら, 1990; Bjorklund, 1992; Isacsonら, 1986; Sanbergら, 1994)。その他の生育できる移植片源として、副腎クロム親和細胞並びに神経成長因子及び栄養因子を分泌する種々の細胞型が挙げられる。神経変性疾患の増殖的治療プロトコルとしての神経組織移植の分野は、臨床試験についてその進展をもたらす多くの注目を受けて

いた。予備結果及び臨床上の観察は有望であるが、移植片拒絶現象が問題を残し

ている。

最近、研究は、セルトーリ細胞が、糖尿病ラットに膵島細胞と同時に移植された時に、宿主組織に対し有効な局所免疫抑制剤として作用することを示唆していた(Selawry及びCameron, 1993)。その結果、移植片が拒絶されず、膵島が生育可能なまま残って、移植された β -細胞を正常に機能させ、かつ無限の期間にわたってインスリンを産生させる。その結果、受け入れられた移植片は高血糖の原発性生理不全を克服し、それによりこの内分泌疾患の関連合併症を軽減する。この細胞移植プロトコルは、膵島がセルトーリ細胞を用いずに移植される時に特別に必要な延長された全身免疫抑制を用いずに行われる。

一般に、全身免疫抑制は、成功した移植がヒトで達成すべきである場合に必要である。全生体（即ち、全身）の免疫抑制は最終的に移植片許容をもたらし得る。しかしながら、それは個体を免疫抑制療法それ自体を或る場合に有利よりも不利にする医療上のリスクに課することにより獲得される。良好な免疫抑制治療の欠如のために、治療選択としてシクロスボリンA (CsA)による全身免疫抑制剤が神経移植プロトコル及びその他の移植プロトコルにおいて付加的療法として使用されていた(Sanbergら, 1994;Freemanら, 1994;Borlonganら, 1995)。議論の余地があるが、全身CsA治療はその全身効果のため、又、CsAそれ自体が有害な副作用を生じることが示され、実際に神経組織に対し細胞毒性であり得るのでCNにおける成功した移植片許容について反生産的(contraproductive)であり得る(Berdenら, 1985;de Groenら, 1984)。

神経変性疾患プロセスを更に有効に遅くし、正常な神経組織生理の再確立を更に積極的に促進し、かつ神経組織機能障害と関連する機能上の能力障害を良く軽減する方法で、パーキンソン病の如き神経変性疾患に既に使用された増殖性細胞移植技術を増進することが望ましいであろう。同様に、宿主により生物学的に寛容される免疫抑制剤により局所で（即ち、移植片部位で）免疫抑制する能力で全身免疫抑制を避けることが望ましいであろう。セルトーリ細胞はこの所望の選択肢を与え得る。何となれば、セルトーリ細胞との同時移植は局所の免疫抑制を送出し、それ故、有効な移植片許容及び組織関連機能障害の機能回復を促進するこ

とが、先に要約したような糖尿病の研究から明らかであるからである。

発明及び利点の要約

本発明によれば、セルトーリ細胞を組織に近位に移植することにより組織中に持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を生じる方法が提供される。

図面の簡単な説明

本発明のその他の利点は、添付図面に関して考慮される場合の下記の詳細な説明を参考にすることにより良く理解されるようになるので容易に認められるであろう。

図1A-Bは二つの代表的な脳切片の光学顕微鏡写真であり、この場合、切片をレクチンで染色し、夫々の脳の左側はクロム親和細胞移植側に相当し、一方、夫々の脳の右側はクロム親和細胞とセルトーリ細胞の同時移植側に相当する。

図2A-Dは図1に示された脳切片の移植部位の図1の光学顕微鏡写真の高倍率を示す。パネルA及びCはクロム親和細胞移植側を示し、一方、パネルB及びDはクロム親和細胞とセルトーリ細胞で同時移植された側を示す。

図3A-Cは対照培地(CM)又はセルトーリ細胞前ならし培地(SCM)中で7日間にわたって単離、培養され、暗視野、干渉コントラスト光学装置で撮影された胎児ラットの腹側中脳(VM)からの細胞を示す光学顕微鏡写真であり、(A)は刺激又は分化の証拠を示さないCM中でインキュベートされたVM細胞を示し、(B)は高度に刺激されたことが明らかであるSCM中でインキュベートされたVM細胞を示し、又(C)は神経突起外殖を示すSCM中でインキュベートされたVM細胞を高倍率で示す。

図4A-Bは脳の線条中の細胞構造及びセルトーリ細胞/クロム親和細胞同時移植片の組織構築を示す電子顕微鏡写真であり、(A)はこれらの細胞に特異な分泌顆粒の混入のために容易に同定された電子稠密なクロム親和細胞(矢印)を示し、又(B)は(A)中の箱形領域を高倍率で高分解能で示し、セルトーリ細胞(矢印)が電子稠密なクロム親和細胞に直ぐに隣接して見られる。

図5A-Bは脳の線条を示す電子顕微鏡写真であり、(A)は侵入道(矢印)及びセルトーリ細胞移植の部位を示し、又(B)は(A)中の箱形領域を高倍率で高分解能

で示し、セルトーリ細胞(矢印)が移植の前に細胞に入れられた1μのラテック

スピード封入体のために容易に同定される。

図6A-Bは脳の線条への移植の前に蛍光標識(DII)でin situ標識された移植されたセルトーリ細胞を示す二つの光学顕微鏡写真であり、(A)はシクロスボリンA(CsA)による免疫抑制治療を受けなかったラット宿主中の生存蛍光セルトーリ細胞を示し、又(B)はシクロスボリンA免疫抑制治療を受けたラット宿主中の生存蛍光セルトーリ細胞を示す。

発明の詳細な説明

本発明は組織中で持続された局在化免疫抑制効果及び栄養効果を生じる方法を提供する。これはセルトーリ細胞を組織に近位に移植する一般工程により行われる。

持続された局在化免疫抑制効果は、移植されたセルトーリ細胞が移植された細胞の如き外来物体の侵入に対する宿主組織により通常とられる免疫応答を抑制すること、かつその免疫抑制がCsAの如き薬剤による免疫抑制の通常の方法により生じる全生体(全身)の全身性免疫抑制によるよりむしろ移植片部位(局所)で生じることを意味する。

組織は、細胞、血液、臓器、及び解離された細胞を含むが、これらに限定されない組織のあらゆる形態を意味する。

好ましい実施態様において、移植された細胞(これらは機能障害細胞を置換し、または或る方法で組織機能障害を軽減することが意図される)は拒絶されることを回避し、それにより生存し、宿主組織に機能上合体することができる。CNS中で、これは正常な神経組織機能の再確立を促進し、それにより治療される神経疾患及び/又は神経変性疾患と関連する挙動上かつ機能上の欠損を回復するであろう。しかしながら、本発明の方法は又神経細胞について記載された技術と同様の技術を利用することにより神経組織/細胞以外のその他の移植可能な細胞又は組織、例えば、内分泌細胞、筋肉細胞、及びその他の細胞とともに利用し得る。更に、本発明の方法は局在化免疫抑制を与えることにより組織及び臓器移植、例えば、肺移植の結果を増進するのに使用し得る。即ち、セルトーリ細胞は移植片生

存及び移植される細胞の移植片機能を促進するのに使用される。

セルトーリ細胞由来免疫抑制剤（これは今部分的に特性決定される）による局所免疫抑制により、セルトーリ細胞それ自体を含む、移植された細胞に対し行われる成功した抗体又は細胞の免疫攻撃はないであろう。更に、免疫抑制は局所であり、しかも生物学的に寛容される薬剤によるものであるので、CsAの如き薬剤の全身免疫抑制及び細胞毒性の両方と関連する副作用が避けられるであろう。それ故、セルトーリ細胞移植の方法は、下記の実施例に示されるように移植に必要な補助療法としてのCsAによる全身免疫抑制の使用に対し有意な改良を与える。

セルトーリ細胞由来免疫抑制剤による局在化免疫抑制は異種移植片及び同種移植片の両方の生存を促進し得る。同種移植片では、セルトーリ細胞との同時移植が全身免疫抑制の必要をなくすように局在化免疫抑制を与えるべきである。異種移植片では、セルトーリ細胞との同時移植が全身免疫抑制の必要をなくすように充分な局所免疫抑制を与えてよく、又はセルトーリ細胞が拒絶を防止し、それにより必要とされる全身免疫抑制剤の投薬量を減少するために全身免疫抑制剤と組み合わせて使用されてもよい。同時移植された時、セルトーリ細胞は免疫抑制を与えるだけでなく、同時移植された組織に対する栄養支持として指定された調節因子、栄養因子、及びその他の因子を与える。それ故、セルトーリ細胞は免疫応答の抑制を与えるだけでなく、同時の栄養支持により同種移植片及び異種移植片の増進された成長及び生存を可能にするであろう。

セルトーリ細胞の源は哺乳類睾丸からの主要な細胞単離による。細胞を回収するためのプロトコルが良く特定されており (Cameron及びMuffly, 1991; Griswold, 1992)、常套方法と考えられる。セルトーリ細胞同時移植の公表された論文の殆どにおいて、細胞はラットに由来する (Selawry及びCameron, 1993)。ラットセルトーリ細胞が下記の実施例に使用されるが、本発明の方法はあらゆる好適な哺乳類源からのセルトーリ細胞とともに使用し得ることが意図されている。ヒトの如き哺乳類に使用するためのセルトーリ細胞の好ましい源はブタセルトーリ細胞である。しかしながら、入手でき、かつ好適な場合、ヒトセルトーリ細胞が使用されてもよい。

一実施態様において、セルトーリ細胞は選択された神経組織又はその他の適當

な組織とともに頭蓋内注入(Sanbergら, 1995)によりCNSに同時移植される。

組織に近位は、セルトーリ細胞が一般に神経組織の如き選択された組織に接近して置かれることを意味する。一般に、これは、セルトーリ細胞が選択された組織に接近して配置されるようになるようになるように哺乳類に注入又は移植し得ることを意味する。例えば、その位置は神経組織、例えば、CNS、PNS又は神経組織を潤す液体、例えば、脳脊髄液及び血液、血管、又は衰弱しているその他の組織、例えば、内皮組織、筋肉組織、末梢臓器、等がある部位であってもよい。神経組織へのセルトーリ細胞の接近は所定の移植で回復されることが求められている特別な神経組織及び機能により決定される。更に、非神経組織を伴う移植片において、セルトーリ細胞の接近は移植される特別な組織により決定される。

移植のための神経細胞の源は治療される神経疾患に依存する。例えば、パーキンソン病は腹側中脳組織(Lindvallら, 1990)又はクロム親和細胞(Lindvallら, 1987)で治療され、ハンチントン病は線条側隆起細胞(Isacsonら, 1986)で治療され、神経痛は副腎クロム親和細胞(Sagenら, 1993)で治療される。ヒト神経変性疾患の特別の動物モデルに実験的に移植されたその他の組織型がいずれかに要約されており(Dunnett及びBjorklund, 1994)、細胞単離方法及び移植方法の詳細な説明を与える。移植されたその他の非神経組織は一般にいずれかに概説されており(Sanberg, 1992)、細胞単離方法及び移植方法の詳細な説明を与える。

又、本発明は、ブタセルトーリ細胞を標的組織に移植することによりその組織中で持続された局在化免疫抑制効果を生じる方法を教示する。例えば、癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、筋ジストロフィー及びその他の神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の運動障害を含む神経疾患を治療するために、ブタセルトーリ細胞を被験者の中枢神経系(CNS)に移植し、その細胞はin situで栄養因子を分泌する。

下記の実施例は本発明の使用の方法、並びに持続された局在化免疫抑制効果を生じるための効力を実証する。

実施例 1

物質及び方法

生後6週の雄のSDラット（これらはハーレン・スプラギューダウレイ社（インジアナポリス、IN）から得られた）を使用した。動物を調節された湿度及び温度を有する部屋中で12時間の明暗サイクルで個々のプレキシグラス・ケージ中に収容した。食事及び水は隨時に自由に入手できた。

細胞培養

ウシクロム親和細胞をイリノイのシカゴ大学にあるジャクリーン・サゲン博士の研究室から入手した。到着後に、血清を含むDMEM-F12培地を使用して細胞を塗布した。トリバンブルー方法を使用する細胞カウントは1ml当たり合計 8×10^6 の生存細胞を明らかにした。クロム親和細胞の95%の生存度を到着の日及び移植の日中に測定した。クロム親和細胞溶液の半分をセルトーリ細胞とともに一夜にわたって同時培養した。

セルトーリ細胞の調製はSelawry & Cameron (Selawry及びCameron, 1993)により記載された方法に従い、この文献が参考として本明細書に含まれる。詳しくは、睾丸を除去し、幾つかの片に細断し、HamのF12/DMEM培地50mlを含む円錐管50mlに入れた。これらの片を2分間にわたって800 X gで遠心分離により1回洗浄した。上澄みを吸引し、組織を無菌の250mlの三角フラスコ中のトリプシン40mg及びDNase0.8mgを含む培地40ml中で再度懸濁させた。フラスコを60-90振動/分で30分間にわたって37°Cの振動インキュベーターに入れた。この工程はライディヒ細胞を除去した。

次いで細管を50mlの円錐管に移し、2分間にわたって800 X gで遠心分離した。上澄みフラクションを吸引し、ペレットを、0.01%の大豆トリプシンインヒビター及びDNase0.8mgを含む40mlの1Mのグリシン、2mMのEDTA中で再度懸濁させ、10分間にわたって室温でインキュベートした。この工程は残存ライディヒ細胞を溶解した。細胞を遠心分離により2分間洗浄し、その工程を2回、又は培地が最早濁らなくなるまで繰り返した。ペレットを三角フラスコ中でコラゲナーゼ20mgを含む培地40ml中でガラスバストツールピペットで穏やかな均質化により再度懸濁させ、60-90振動/分で5分間にわたって37°Cでインキュベートした。

細胞懸濁液を2分間にわたって800×gで遠心分離し、コラゲナーゼ40mg及びDNase0.2mgを含む培地40ml中でバスツールピペットで穏やかな均質化により再度懸濁させ、60-90振動/分で30分間にわたって37°Cで三角フラスコ中でインキュベートした。次いで細胞を2分間にわたって遠心分離により洗浄し、そのプロセスを少なくとも3回繰り返して管周囲の細胞を排除した。細胞を、ヒアルロニダーゼ40mg及びDNase0.2mgを含む培地40ml中でバスツールピペットで穏やかな均質化により再度懸濁させ、60-90振動/分で30分間にわたって37°Cでインキュベートした。細胞を2分間にわたって軽度の遠心分離によりペレットにし、少なくとも5回洗浄して生殖細胞を排除した。

得られたセルトーリ細胞に富むフラクションを移植の少なくとも24時間前にクロム親和細胞を含む培地0.25ml中で再度懸濁させた。移植の日中に、セルトーリ細胞に富むフラクションを含む溶液及びクロム親和細胞を、バスツールピペットを使用して再度懸濁させ、次いでゲージ20のらせん針を有するハミルトン・シリジにより吸引した。

手術

手術操作を、当業界で公知であるように、無菌条件で行った(Pakzabanら, 1993)。全ての動物を0.60ml/kgのナトリウムペントバルビタールで初期麻酔し、次いでコフ(Koph)定位手術装置に入れた。前後方向=+1.2、中外側=+/-2.8、背腹=6.0、5.9、及び5.8 (Paxinos及びWatson, 1984の環椎を基準とする)にセットした座標を使用して、両側線条移植を行った。脳の右半球にウシクロム親和細胞を移植し、一方、左半球はクロム親和細胞+セルトーリ細胞を受けた。夫々の側は合計3μlの細胞カクテル溶液(DV部位当たり1μl)を受けた。手術後、動物を回復まで加熱パッドの上に置いた。手術直後及び移植後の日に、シクロスボリンA(20mg/kg/d, i.p.)を使用して、動物が短い経過の免疫抑制を受けた。全ての動物を移植後1ヶ月で犠牲にした。

組織学

動物を0.70ml/kgのナトリウムペントバルビタールで麻酔し、次いで500mlの0.9%の等張食塩水及び500mlのパラホルムアルデヒドで灌流した。次いで動物を

断頭し、脳を除去し、PBS中30%の蔗糖を含む40%のパラホルムアルデヒド中で一夜にわたって後固定した。翌日、脳切片を、ビブロスライス（カンプデン・インストルメント、UK）を使用して30ミクロンで切断した。宿主組織の免疫応答を、レクチン方法（以下を参照のこと）を使用して分析した。三つの実験は盲検ランダム化様式で脳の左側及び右側の独立の定性比較を行った。

レクチン方法

ビブロトム(vibrotome)切開後に、脳切片を15-30分間にわたって0.1%のトリトンX-100を入れた。次いで切片を、0.1mMのCaCl₂、0.1mMのMgCl₂を含む0.1Mのカチオン性PBS(pH7.2)中で洗浄した。切片のインキュベーションをカチオン性PBS中でつくった20.0 μ g/mlのレクチン中で2時間にわたって4℃で行った。PBS中で3回のすすぎをDABと一緒にインキュベーションの前に行った。DAB原液を、DAB 10mgをリン酸緩衝液(0.1M、pH7.2)20mlに溶解し、1%のCoCl₂0.5mlを攪拌しながらDAB溶液に添加することによりつくった。切片をDAB溶液中で15分間にわたって最初にプレインキュベートした。3%のH₂O₂0.6mlをDAB溶液20.5mlに添加した後、インキュベーションが5~10分間、又は適当な反応に達するまで続いた。切片をPBS中で3回再度すすいだ。最後に、切片を蒸留水にとって塩を洗浄して除いた。

結果

両方の移植片部位の組織分析は、クロム親和細胞単独で移植された側がクロム親和細胞+セルトーリ細胞で移植された側よりも大きなグリア浸潤及び多数のマクロファージを有することを明らかにした（図1 & 2）。グリア応答の有意な相違はシクロスボリンで治療された動物とシクロスボリンで治療されなかった動物の間で観察されなかった。

データから二つの結論をした。1)移植された細胞に対する宿主組織の免疫応答を抑制することが明らかであったセルトーリ細胞の局在化効果、及び2)CsA投与の短い過程による、又はそれによらない持続された免疫抑制が、クロム親和細胞

とセルトーリ細胞の同時移植により得られる（図4）。

それ故、セルトーリ細胞は直接の頭蓋内注入によりCNS中で免疫学的に特典を

与えられた部位を与えることが結論し得る。更に、本研究において異種移植後に得られた有意な免疫抑制により、セルトーリ細胞は同種移植後に免疫学的に特典を与えられた部位を生じることについて大きな有益な効果を与えることができ、かつ免疫上かつ栄養上の支持により移植片の生存及び組込みを増進することができる。

実施例2

特別なプロトコル：

プロトコルは三つの基本的な工程、セルトーリ細胞単離、神経の特別な細胞又はその他の適当な細胞との同時培養及びCNSへの同時培養物の移植を伴う（細胞単離に関する詳細について、Selawry及びCameron(1993)、又、細胞移植に関する詳細について、Pakzabanら(1993)を参照のこと）。

1A. セルトーリ細胞単離

単離操作は文献(Selawry及びCameron, 1993)に記載されたような良く特定された方法に従う。全ての単離工程に使用され、細胞がインキュベートされた細胞培地は、レチノール、ITS、及びゲンタマイシンスルフェートを補給したDMEM:Hams F12(Cameron及びMuffly, 1991)であった。睾丸を生後16日の雄のSDラットから手術により集めた。睾丸を被膜脱離し、酵素消化のために調製してセルトーリ細胞からその他の睾丸細胞型を分離した。コラゲナーゼ(0.1%)、ヒアルロニダーゼ(0.1%)、及びトリプシン(0.25%)を使用する酵素操作が多くの細胞分離プロトコルにルーチンで使用される。連続酵素消化後に、セルトーリ細胞単離物を培地で洗浄し、無菌細胞培養容器に移し、保湿された、5%CO₂-95%空気の組織培養インキュベーターに入れた。39°Cのインキュベーター中の48時間のプレインキュベーション後に、セルトーリ細胞を洗浄して汚染デブリを除去した。得られるセルトーリ細胞に富むフラクションをDMEM/F12培地0.25ml中で再度懸濁させ、少なくとも24時間にわたって37°Cでインキュベートした。

セルトーリ細胞を0.01%のトリプシンで容器の床から放出し、無菌の円錐試験

管に移し、遠心分離により繰り返し洗浄し、次いでトリプシンインヒビターで処理してトリプシンの酵素作用を停止した。移植の日の間に、セルトーリ細胞に富

むフラクションを再度懸濁させ、20ゲージのらせん針を有するハミルトンシリングにより吸引した。

1B. セルトーリ細胞の単離及び前処理

既に記載されたように(Cameron及びMuffly, 1991)、0.25%のトリプシン(シグマ)及び0.1%のコラゲナーゼ(シグマ、型V)(Cameron及びMuffly, 1991)を使用して、被膜脱離されたラット睾丸を37°Cで連続酵素処理にかけた。得られるセルトーリ細胞凝集物を75cm²の組織培養フラスコ(コスター)中の20mlの容積のインキュベーション培地中に均等に分配した。塗布されたセルトーリ凝集物を48時間にわたって5%CO₂-95%空気中で39°Cでインキュベートし、その後、細胞を1分間にわたって無菌の0.5mMのトリス-HCl緩衝液による低張処理(Galdieriら, 1981)にかけて汚染生殖細胞の除去を促進した。インキュベーション培地で2回洗浄した後、フラスコにインキュベーション培地20mlを再度補給し、5%CO₂-95%空気中で37°CでCO₂噴射インキュベーターに戻した。得られる前処理されたセルトーリに富む单一培養物は95%より多いセルトーリ細胞を含んでいた。塗布密度(<2.0 X 10⁶ セルトーリ細胞/cm²)は細胞の集密単層をもたらさなかった。

2. 神経の特別な細胞との同時培養

神経変性モデルについてセルトーリ細胞及び移植に特別な神経細胞をトリプシン(0.01%)により懸濁させ、培地で3回洗浄し、移植の前に24時間にわたって無菌の細胞培養容器に入れた。得られる同時培養物を、移植に使用されるまで37°Cの5%CO₂-95%空気のインキュベーターに入れた。

3. CNSへの同時培養物の移植

移植プロトコルはPakzabanら(1993)により既に記載された操作に従う。動物の手術を無菌条件下で行った。全ての動物を0.60ml/kgのナトリウムベントバルビタールで初期麻酔し、次いでコフ(Koph)定位手術装置に入れた。パーキンソン病モデルについて、前後方向=+1.2、中外側=+/-2.8、背腹=6.0、5.9、及び5.8

(Paxinos及びWatson, 1984の環椎を基準とする)にセットした座標を使用して、一側性線条移植を行った。又、異なる座標をPaxinos及びWatson(1984)に基いて異なる神経変性動物モデルについて使用した。病変した黒質に同側性の線条に

セルトーリ細胞又はセルトーリ細胞同時培養物を移植した。夫々の線条は全容積 $3 \mu 1$ のセルトーリ細胞又は同時培養物懸濁液を受ける。細胞懸濁液 1 マイクロリットルを背腹部位に対し 1 分間にわたって注入した。針を引っ込める前に最後の背腹部位に達した後、更に 5 分間経過させた。手術後、動物を、それらが回復するまで加熱パッドの上に置いた。手術直後及び移植後の日に、シクロスボリン A (20mg/kg/d, i.p.) を使用して、動物が短い経過の免疫抑制を受けた。

セルトーリ細胞及び／又は同時培養懸濁液を、パーキンソン病の例に示されるように、特定の疾患について規定された定位手術座標により種々の神経変性疾患の動物モデルに移植する。全ての実験動物をその動物モデルに特別の技術により機能回復について系統的に評価する。

実施例 3

図4Aは、電子稠密クロム親和細胞（矢印）が細胞に特異な分泌顆粒の混入のために容易に同定されたことを示す。図4Bは図4A中の箱形領域を高倍率で示し、高分解能で、セルトーリ細胞（矢印）が電子稠密クロム親和細胞に直ぐに隣接して検出された。これは脳中のセルトーリ細胞とともに同時移植された副腎クロム親和細胞の生存を実証する。

(1) 神経細胞の成長

インキュベーション培地及びセルトーリ細胞前ならし培地

セルトーリ細胞培養及び同時培養に使用したインキュベーション培地は、3mg/mlのL-グルタミン（シグマ、銘柄III）、0.01cc/mlのインスリンートラヌスフェリンーセレン（ITS、コラボラチブ・リサーチ社）、50ng/mlのレチノール（シグマ）、 $19 \mu 1/ml$ の乳酸（シグマ）及び0.01cc/mlのゲンタマイシンスルフェート（ギブコ）を補給した、1:1で混合されたダルベッコ最小必須培地:Hams F12栄養培地（ウィットテーカー・バイオプロダクツ）であった。

単離したセルトーリ細胞の最初の48時間のインキュベーション期間後に、培地を回収し、5分間にわたって1500rpmで遠心分離した。上澄みを回収し、直ちに無菌試験管中で凍結した。この培地をセルトーリ前ならし培地(SCM)と同定した。

胎児脳細胞の単離及びインキュベーション

胎児脳細胞(FBC)を胎児ラット(15-17日の妊娠)の腹側中脳から回収した。胎児脳組織を培地中に懸濁させ、それを一連の連続的に減少するサイズの皮下注射針(18-26ゲージ)に通すことにより最初に分散させた。得られる懸濁液を5分間にわたって0.1%のトリプシンで処理し、続いて2分間にわたって0.1%のトリプシンインヒビターで処理した。懸濁したFBCを3回洗浄し、インキュベーション培地中に再度懸濁させ、ポリーエチレン被覆培養容器に塗布した。

胎児ラットの腹側中脳(VM)からの細胞を単離し、図3Aに示されたように、対照培地(CM)又はセルトーリ細胞前ならし培地(SCM)中で7日間にわたって培養した。CM中でインキュベートしたVM細胞は細胞の刺激又は分化の証拠を示さなかった。図3Bを参照して、SCM中でインキュベートしたVM細胞は高度に刺激された。図3Cは、高倍率で、SCM中でインキュベートしたVM細胞が神経突起外殖を示すことを示す。

実施例4

ラテックスビーズの混入：

セルトーリ細胞を単離し、記載されたようにしてインキュベーションのために調製した。移植の前(約12時間)、無菌の1μmのラテックスビーズ(10μg/ml)の培地、ペルコ、タスチン、CA)をインキュベーション培地に添加した。セルトーリ細胞はビーズを迅速に貪食した。移植の直前に、ビーズ処理されたセルトーリ細胞を洗浄(3回)し、インキュベーション培地1ml中で再度懸濁させた。

図5Aを参照して、セルトーリ細胞を脳の線条に移植し、その図に侵入道(矢印)及びセルトーリ細胞移植の部位が示される。図5Bに示されたような高倍率で、セルトーリ細胞(矢印)を、移植の前にセルトーリ細胞に装填された1μのラテックスビーズの混入のために容易に同定した。

実施例5

移植したセルトーリ細胞の生存に関するシクロスボリンA(CSA)の効果

蛍光細胞標識：

移植の直前(約2時間)に、セルトーリ細胞単一培養物を細胞トラッキング(1

00 μ lの原液/1ml培地；モレキュラー・プローブズ社(オイゲン、OR))のために37℃で7分間にわたってCM-DiI蛍光色素で処理し、次いで更に15分間にわたって冷蔵庫(4℃)に入れた。蛍光“標識された”セルトーリ細胞を洗浄し(3回)、インキュベーション培地1ml中で再度懸濁させた。

*in situ*で移植されたセルトーリ細胞の生存に関するシクロスボリンAの効果を調べた。移植されるセルトーリ細胞を脳の線条への移植の前に蛍光標識(DiI)で標識した。その組織を移植後1ヶ月で回収した。図6Aを参照して、生存蛍光セルトーリ細胞が、シクロスボリンAによる免疫抑制治療を受けなかったラット宿主中で見られた。図6Bを参照して、生存蛍光セルトーリ細胞が、シクロスボリンA免疫抑制治療を受けなかったラット宿主中に示される。この実施例は、シクロスボリンAが脳に移植されたセルトーリ細胞の生存に必要ではないことを実証する。

この出願中で、種々の刊行物が引用により参照される。刊行物に関する充分な引用が以下にリストされる。本発明が関係する技術水準を更に充分に記載するために、これらの刊行物のそのままの開示がこの出願への参照により本明細書に含まれる。

本発明が例示の様式で記載され、使用される用語は限定ではなく、説明の性質であることが意図されることが理解されるべきである。

明らかに、本発明の多くの改良及び変化が上記教示に鑑みて可能である。それ故、請求の範囲内で、本発明は明記された以外に実施し得ることが理解されるべきである。

REFERENCES CITED

Berden et al., "Severe central nervous system toxicity associated with cyclosporine" Lance 26:219-220 (1985).

Bjorklund and Stenevi, "Intracerebral neural grafting: a historical perspective" in Bjorklund, A. and U. Stenevi, eds. Neural grafting in the mammalian CNS, Amsterdam: Elsevier, 3-11 (1985).

Bjorklund, "Dopaminergic transplants in experimental Parkinsonism: Cellular mechanisms of graft-induced functional recovery" Current Biology, 2:683-689 (1992).

Borlongan et al., "Cyclosporine-A increases spontaneous and dopamine agonist-induced locomotor behavior in normal rats" Cell Transplant., 4:65-73 (1995).

Borlongan et al. "PR: Systemic 3-nitropropionic acid: Behavioral deficits and striatal damage in rats", Brain Research Bulletin, 36:549-556 (1995).

Cameron et al., "Successful islet/abdominal testis transplantation does not require Leydig cells" Transplantation, 50:649-653 (1990).

Cameron and Muffly, "Hormonal regulation of spermated binding to Sertoli cells in vitro" J.Cell Sci., 100:532-533 (1991).

de Groen et al., "Central nervous system toxicity after liver transplantation" N. Engl. J. Med. 309:861-866 (1984).

Dunnett and Bjorklund, Functional Neural Transplantation, Advances in Neuroscience, Volume 2, Raven Press, New York.

Freeman et al., "The USF protocol for fetal nigral transplantation in Parkinson's disease" Experimental Neurology, 129:6-7 (1994).

Griswold, "Protein secretion by Sertoli cells: general considerations" in Russel, L.D. and M.D. Griswold, eds. The Sertoli Cell, Cache River Press, Clearwater, FL., 195-200.

Isacson et al., "Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease" Proc. Natl. Acad. Sci., 83:2728-2732 (1986).

Koutouzis et al., "PR: Systemic 3-nitropropionic acid: Long term effects on locomotor behavior" Brain Research, 646:242-246 (1994).

Lindvall et al., "Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen" Ann. Neurol., 22:457-468 (1987).

Lindvall et al., "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease" Science, 247:574-577 (1990).

Pakzaban et al., "Increased proportion of Ache-rich zones and improved morphological integration in host striatum of fetal grafts derived from the lateral but not the medial ganglionic eminence" Exp. Brain Res., 97:13-22 (1993).

Paxinos and Watson, "The rat brain in stereotaxic coordinates" Sydney, Academic Press (1984).

Sagen et al., "Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances" J. Neurosci. 13:2415-2423 (1993).

Sanberg, PR. (Editor-in-chief) "Cell Transplantation", Elsevier Science Publishers, New York, 1992-Present

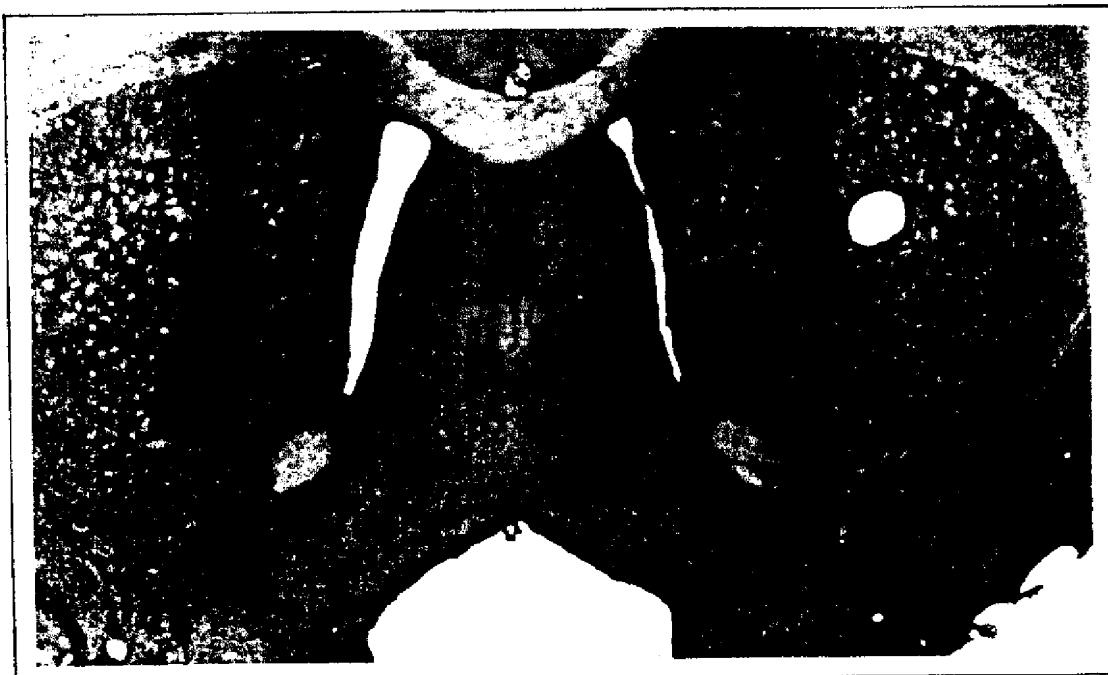
Sanberg et al., "Cell transplantation for Huntington's disease" R.G. Landes Co., Boca Raton, FL, pp. 19-21 (1994).

Sanberg et al., "Sertoli cells induce immunoreactivity and functional recovery following transplantation into the striatum of 6-OHDA lesioned rats (in preparation). (1995).

Selawry and Cameron, "Sertoli cell-enriched fraction in successful islet cell transplantation" Cell Transplant., 2:123-129 (1993).

Wictorin et al., "Reformation of long axon pathways in adult rat CNS by human forebrain neuroblasts" Nature, 347:556-558 (1990).

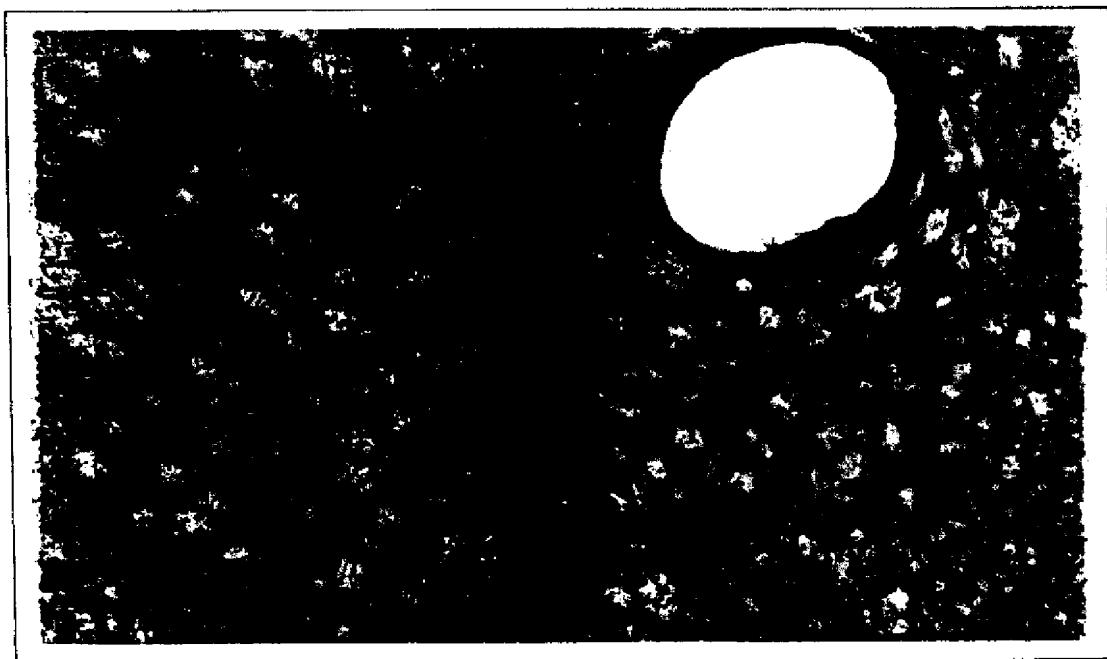
【図1】

*Fig - 1A**Fig - 1B*

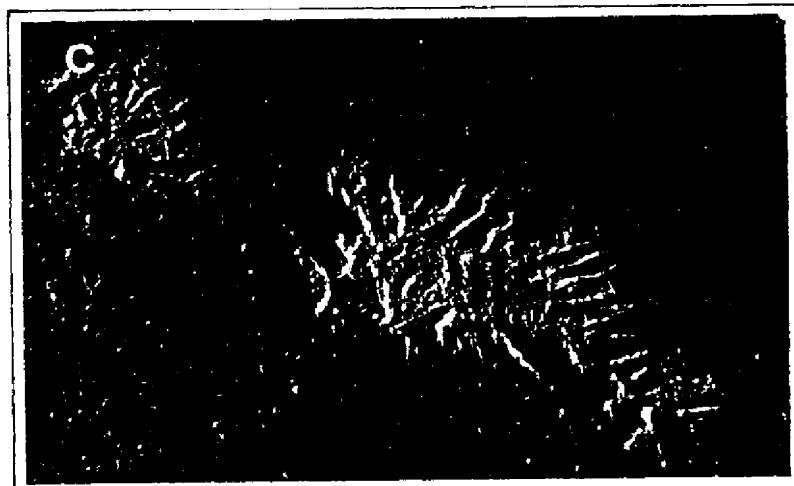
【図2】

Fig - 2AFig - 2B

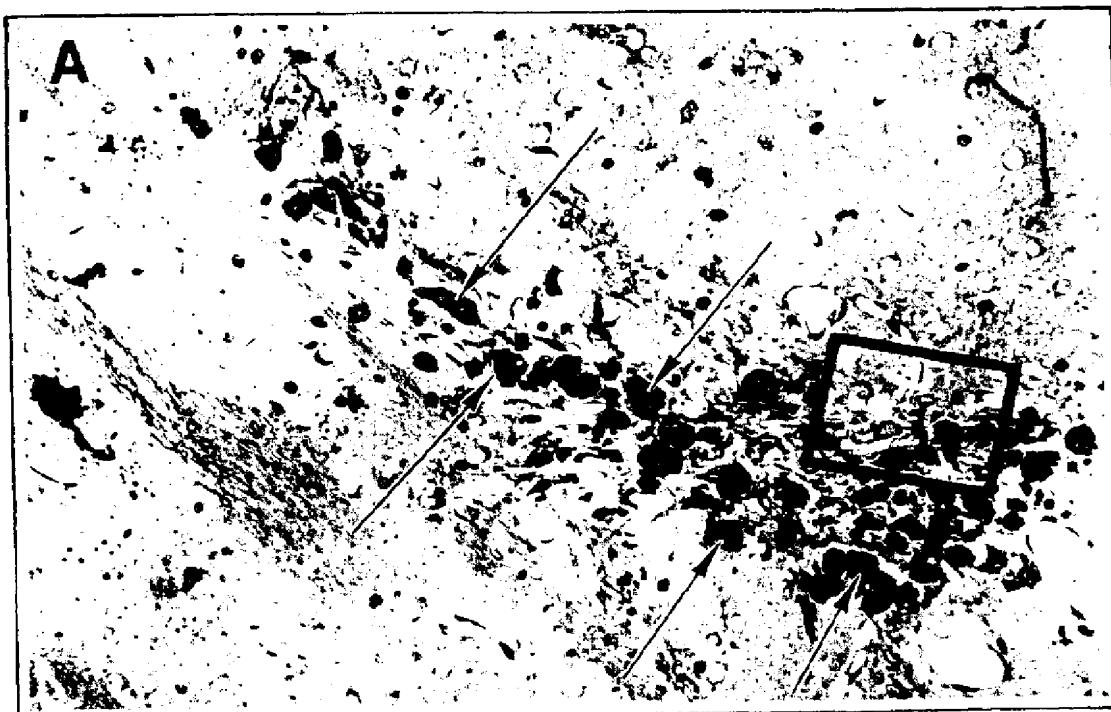
【図2】

Fig-2CFig-2D

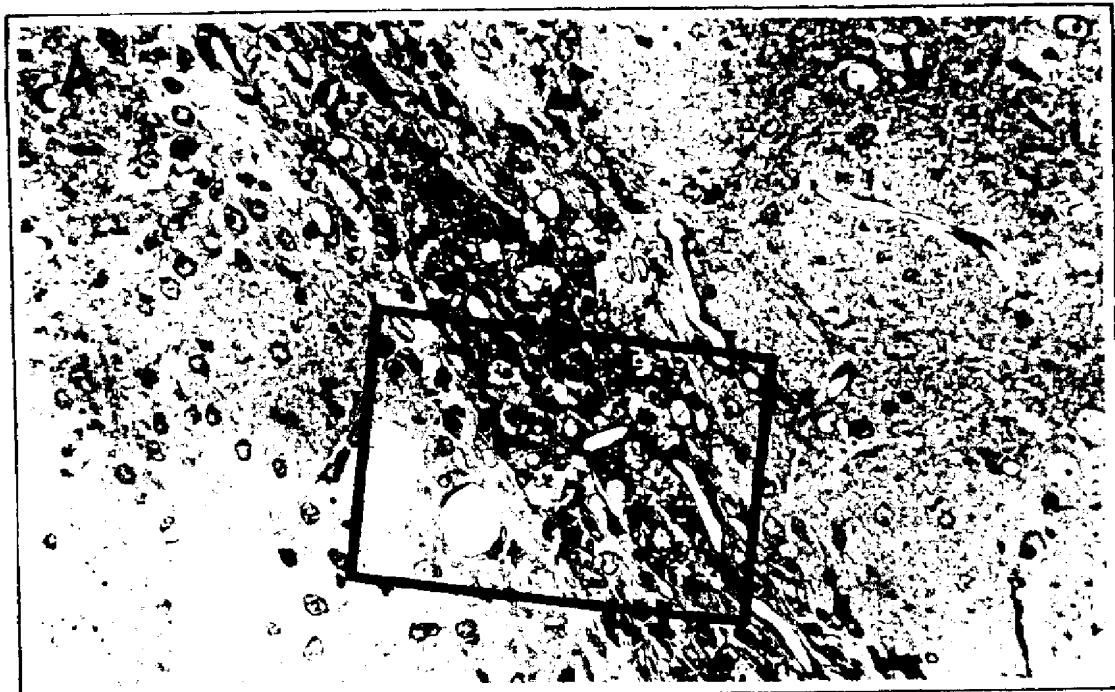
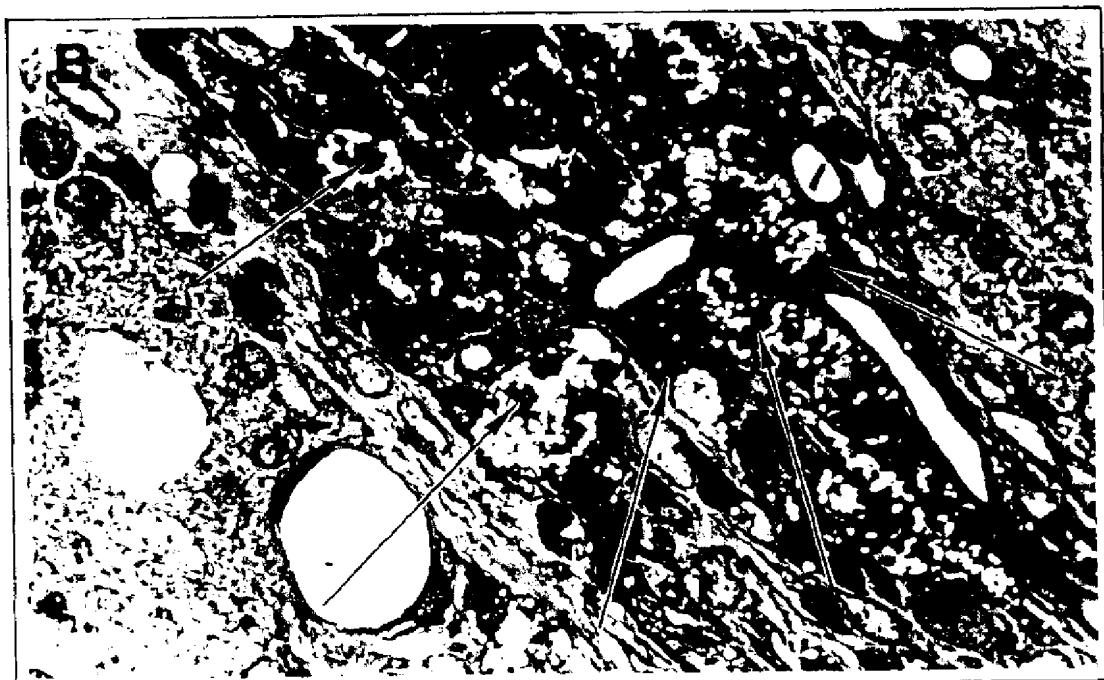
【図3】

Fig - 3AFig - 3BFig - 3C

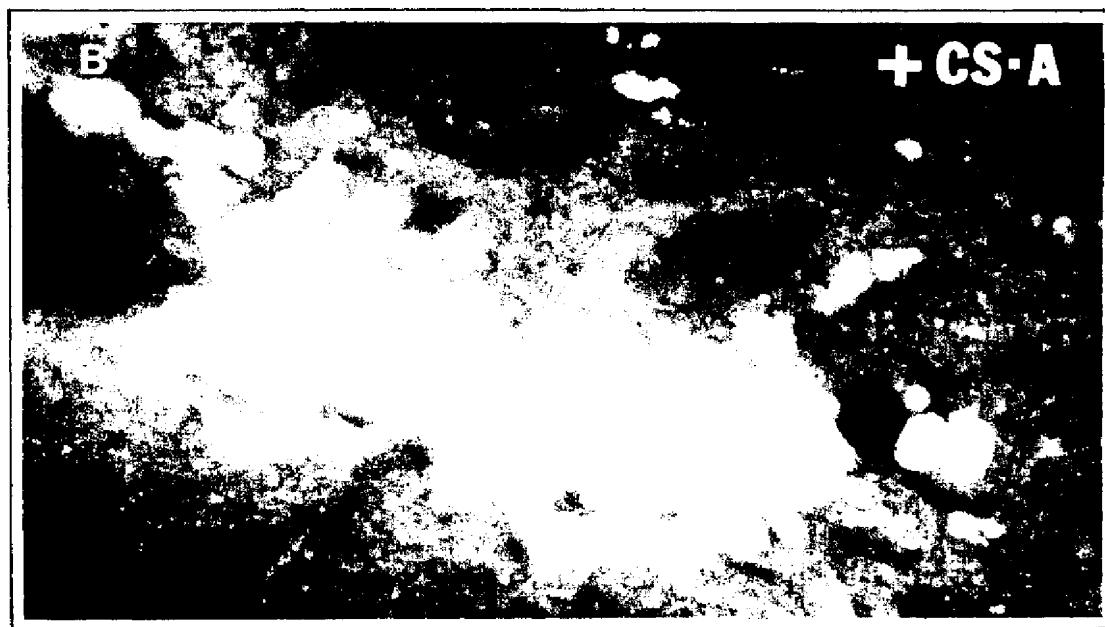
【図4】

Fig - 4AFig - 4B

【図5】

Fig - 5AFig - 5B

【図6】

*Fig-6A**Fig-6B*

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/03337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(6) :A61K 35/00, 35/30, 35/48 US CL :424/93.1, 93.7, 559 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.1, 93.7, 559		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cell Transplantation, Volume 2, issued 1993, Selawry et al, "Sertoli Cell-Enriched Fractions In Successful Islet Cell Transplantation", pages 123-129, see entire document.	1 ----
Y	The Journal of Neuroscience, Volume 13, Number 6, issued June 1993, Sagen et al, "Transplants of Immunologically Isolated Xenogeneic Chromaffin Cells Provide a Long-Term Source of Pain-reducing Neuroactive Substances", pages 2415-2423, see entire document.	2-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 11 MAY 1996	Date of mailing of the international search report 13 JUN 1996	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer PATRICIA A. DUFFY Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/03337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	Society For Neuroscience Abstracts, Volume 21, Part 1, issued November 1995, Sanberg et al, "Functional Recovery In Hemiparkinsonian Rats Following Neural Transplantation of Testis-Derived Sertoli Cells", page 317, see abstract 133.12.	2-18
Y	EOS-Rivista Di Immunologia ed Immunofarmacologia, Volume 12, Number 2, issued 1992, DeCesaris et al, "Inhibition of Lymphocyte Activation By Sertoli Cell Immunosuppressive Factor(s)", page 86, see entire abstract.	2-18
Y, P	Nature, Volume 377, issued 19 October 1995, Bellgrau et al, "A role for CD95 Ligand in preventing graft rejection", pages 630-632.	2-18
A	Critical Reviews in Neurobiology, Volume 8, Number 3, issued 1994, Koutouzis et al, "Cell Transplantation for Central Nervous System Disorders", pages 125-161, see entire document.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/03337

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

MEDLINE, CAB ABSTRACTS, APS, EMBASE, DERWENT WPI, DERWENT BIOTECHNOLOGY ABSTRACTS,
CONFERENCE PAPERS INDEX, JAPIO, BIOSYS
search terms: transplantation, sertoli cells, immunosuppression, trophic, factors, porcine, co-transplantation

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S
Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD
, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, BB, BG
, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU,
IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, L
V, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL
, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US,
UZ, VN

(72)発明者 カメロン ドン エフ
アメリカ合衆国 フロリダ州 33549 ル
ツ クリラー レイク ドライヴ
18206
(72)発明者 ボーロンガン セサリオ ヴィ
アメリカ合衆国 フロリダ州 33549 ル
ツ ジェイムズタウン 17802エイ